

## 가토 신피질 절편에서의 K-pNPPase 활성화에 대한 Ouabain 및 Vanadate의 영향

부산대학교 의과대학 생리학교실

우 재 석·김 용 근·이 상 호

=Abstract=

### Effects of Ouabain and Vanadate on K-pNPPase Activity in Rabbit Renal Cortical Slices

Jae Suk Woo, Yong Keun Kim and Sang Ho Lee

*Department of Physiology, College of Medicine, Pusan National University*

This study was carried out to investigate whether the K-pNPPase activity in renal cortical slices can be used as an index for measuring the activity of  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  exchange pump.

The K-pNPPase activity, ouabain-sensitive oxygen consumption and intracellular electrolytes content in slices, and Na-K-ATPase activity in microsome were measured and the effects of ouabain and vanadate on these were observed.

The results are as follows:

1) p-NPPase activity in slices increased linearly with incubation time during 60 minutes, and  $\text{K}^+$ -dependent, ouabain-sensitive fraction was about 55% of total p-NPPase activity. This value was almost the same through out the incubation time.

2) The concentrations of ouabain and vanadate for 50% inhibition of K-pNPPase activity were  $7.0 \times 10^{-6}\text{M}$  and  $1.3 \times 10^{-5}\text{M}$ , respectively.

3) The ouabain-sensitive oxygen consumption in slices was reduced to 50% of control value by  $6.3 \times 10^{-6}\text{M}$  ouabain or  $2.5 \times 10^{-5}\text{M}$  vanadate. These concentrations were similar to those for 50% inhibition of K-pNPPase activity.

4) The trends of intracellular electrolytes change by ouabain and vanadate were similar to those of the change in K-pNPPase activity.

5) The Na-K-ATPase activity in microsome prepared from renal cortex was completely inhibited by  $10^{-3}\text{M}$  ouabain or  $10^{-3}\text{M}$  vanadate and the concentration for 50% inhibition was  $1.2 \times 10^{-6}\text{M}$  in ouabain and  $1.6 \times 10^{-6}\text{M}$  in vanadate, which were much lower than those for K-pNPPase activity or ouabain-sensitive oxygen consumption in slices.

These results indicate that K-pNPPase activity measured in renal cortical slices is a better index for evaluating  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  exchange pump activity than Na-K-ATPase activity measured in microsome.

### 서 론

신장을 포함한 여러 조직의 세포막에서 많은 유기

물질이  $\text{Na}^+$ 에 의존하여 이동하기 때문에<sup>32)</sup>  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ 교환 펌프에 관계하는 Na-K-ATPase는<sup>10, 33, 35)</sup>  $\text{Na}^+$ 의 이동뿐만 아니라 다른 물질의 이동에도 중요한 효소로 알려져 있다<sup>17, 23)</sup>. 따라서 이러한 조직에서 어떤 약물

이 유기 물질의 이동에 영향을 미칠 때 Na-K-ATPase에 직접 작용함으로써 그 효과를 나타내는지를 밝히기 위해서는 효소 활성에 대한 영향을 관찰하고 있으나 지금까지 일반적으로 이용되고 있는 방법으로는 이 효소의 활성을 정상 세포막에서는 직접 측정하기 어렵다. 그 이유는 Na-K-ATPase의 기질인 ATP는 세포막 내에서만 효소와 결합하는데<sup>1)</sup>, 생체에서 분리, 조작한 조직 세포내에 남아 있는 ATP만으로는 ATPase 활성을 측정하기 어려우며 배양액에 ATP를 첨가해 주더라도 세포내로 들어가기 어렵기 때문이다. 따라서 Na-K-ATPase 활성은 세포막을 파괴한 homogenate나 여기서 분리한 microsome 등에서만 측정이 가능한데 이렇게 측정된 Na-K-ATPase 활성에 대한 어떤 약물의 효과는 정상 세포막에 대한 효과와 다를 가능성이 많다. Spencer 등<sup>30)</sup>도 신피질 절편에서 측정된 ouabain에 의한 세포내 Na<sup>+</sup>이나 K<sup>+</sup>함량 변화와 homogenate에서 측정된 Na-K-ATPase 활성의 변화가 서로 다르기 때문에 homogenate에서 측정된 Na-K-ATPase 활성의 변화를 절편에서의 효소활성 변화로 보기는 어렵다고 하였다. 또 1975년 Charney 등<sup>31)</sup>에 의해 in vitro에서 강력한 Na-K-ATPase 억제 물질로 보고된 vanadate도 정상세포에서나 in vivo에서는 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>교환 펌프 억제에 연관된 효과는 미미한 것으로 보고된 바 있다<sup>29)</sup>.

정상 세포막에서 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>교환 펌프의 활성을 나타내는 간접적 지표로는 세포내 전해질 함량 변화나 산소소모량의 변화가 많이 이용되어져 왔다. 세포내 전해질 함량의 변화는 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>교환 펌프의 활성과 밀접히 연관되어 있는 것으로 알려져<sup>10, 17, 23)</sup> 신피질 절편등에서 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>교환 펌프의 활성 변화를 관찰하는데 널리 사용되어져 왔으나 수동적인 이동에 의해서도 영향을 받을 수 있으며, 특히 최근에는 신장의 근위세뇨관에 ouabain에 영향을 받지 않는, 즉 Na-K-ATPase와 관계없는 Na<sup>+</sup>-pump가 존재한다는 보고도<sup>30, 34, 40)</sup> 있어 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>교환 펌프 이외의 효과를 완전히 배제할 수 없을 뿐만 아니라, 신 절편에서 세포내 전해질 함량을 측정하는 데는 하루 이상의 시간과 여러가지 조작이 필요한 단점이 있다.

또한 신피질 절편<sup>41)</sup>과 분리된 신세뇨관<sup>30)</sup>에서 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>펌프의 활성과 ouabain에 의해 억제되는 산소 소모량 간에 밀접한 관계가 있음이 보고되었으나 Gubitcz 등<sup>16)</sup>은 ouabain에 의해 억제되는 산소 소모량이 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>교환펌프에 연관된 부분보다 더 크다고 보고하였으며, 일부 대사 억제제들과 같이 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>교환 펌프의 활성과 조직 산소 소모량에 대해 나타내는 효과가 서로 다를

때에는 산소 소모량으로써 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>교환 펌프의 활성 변화를 측정하기 곤란하다고 하였다.

신장의 근위세뇨관에서 기저막을 통한 물질 이동에 대한 연구는 피질 절편을 이용하는 실험 방법을 통해 많이 이루어져 왔다. 그러나 Na-K-ATPase 활성은 신 절편에서 직접 측정하지 못하고 homogenate나 microsome을 분리하여 측정함으로써 신절편에서 나타나는 효소 활성으로 대신하였으나 이는 앞에서 언급한대로 여러가지 문제점을 지니고 있다.

따라서 저자들은 신피질 절편에서 직접 Na-K-ATPase 활성을 측정할 수 있는 방법을 모색하던 중, 이 효소의 일부로 알려져 있고<sup>21, 33)</sup> 세포막 바깥층에서 효소활성을 나타내는<sup>2, 33)</sup> K<sup>+</sup>-dependent p-nitrophenylphosphatase(K-pNPPase) 활성을 측정하여 이에 대한 ouabain 및 vanadate의 효과를 관찰하고, 동시에 산소 소모량 및 세포내 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>함량의 변화를 비교 관찰하여 세포막을 파괴하여야만 측정할 수 있는 Na-K-ATPase 활성 대신 세포막을 파괴하지 않는 절편에서 K-pNPPase 활성을 측정함으로써 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>교환 펌프 활성의 변화 정도를 관찰할 수 있는지를 확인하기 위하여 이 연구를 행하였다.

## 실험재료 및 방법

### 1) 신피질 절편 제작 및 microsome의 분리

체중 2~3 kg의 가토를 암수 구별 없이 사용하였다. 가토의 경추부를 타격, 탈골시켜 희생한 후 신장을 적출하여 피막을 벗기고 130 mM NaCl, 10 mM KCl, 1.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 20 mM Tris-HCl(pH 7.4)로 된 냉한 용액에 담근 다음 혈액을 제거하기 위해 신장을 위의 용액 30~40 ml로 약 150 cmH<sub>2</sub>O의 압력으로 관류시켰다.

신피질 절편은 Staddie-Riggs microtome으로 0.3~0.5 mm의 두께로 제작하였다.

Microsome은 Jørgensen과 Skou<sup>18)</sup>의 방법으로 분리했으며 단백질 농도는 bovine serum albumin을 표준용액으로 하여 Lowry 등<sup>27)</sup>의 방법으로 측정하였다.

### 2) Incubation 용액의 조성 및 incubation 과정

Incubation 용액은 130 mM NaCl, 10 mM KCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM glucose, 10 mM Tris-HCl(pH 7.4)로 조성된 용액을 사용하였으며 p-NPPase 활성을 측정할 때는 Na<sup>+</sup>대신 choline으로 대체한 용액을 사용하였다. 모든 실험은 incubation 용액에 산소를 공

급하면서 30분간 평형시킨 후 행하였으며 약물의 효과를 볼 때는 약물이 포함된 용액을 10분간 preincubation을 한 후에 반응을 시작하였다. Incubation시 용액 5 ml에 20~30 mg의 조직 절편을 사용하였으며 계속 산소를 공급하였고 20°C의 온도에서 행하였다.

### 3) K-pNPPase 활성의 측정

K<sup>+</sup>-dependent p-nitrophenylphosphatase 활성의 측정은 Stewart 및 Sen<sup>39)</sup>이 오리<sup>39)</sup>의 salt gland에서 행한 방법을 수정하여 이용하였다. 즉, 절편조직을 4.5 ml의 incubation 용액에서 10분간 preincubation한 후 50 mM p-nitrophenyl phosphate(p-NPP)용액 0.5 ml을 첨가하여 반응을 시작하였다. 반응 30분후 용액에 분해되어 나온 p-nitrophenol(p-NP)의 양을 흡광도 410 nm에서 측정하였으며, 절편은 꼬집어내어 가야제로써 물기를 제거하고 무게를 측정하였다. K-pNPPase 활성도는 총 p-NPPase 활성에서 1 mM ouabain 존재시의 활성을 뺀 값으로 하였으며  $\mu\text{mole of p-NP liberated/gm wet tissue/hr}$ 로 나타내었다.

### 4) 조직의 산소 소모량의 측정

신피질 조직 절편의 산소 소모량은 clark-type의 산소 전극(YSI model 53)을 사용하여 25°C에서 측정하였다. 반응을 시작한지 10분 후부터 15분간의 산소 분압의 감소를 측정하여 0°C, 1기압, 전조 공기 상태에서의  $\mu\text{l O}_2/\text{gm wet tissue}/\text{min}$ 으로 나타내었다.

### 5) 세포내 Na<sup>+</sup> 및 K<sup>+</sup>함량의 측정

Incubation이 끝난 후 절편을 꼬집어내어 가야제 및 여과지로 절편 주위 수분을 제거하고 무게를 잰 후 건조기에서 90°C를 유지하면서 완전히 말린 후 무게를 재어 조직내 수분 함량을 계산하였다. 건조된 조직을 진한 질산에 녹인 후 Beckman kline flame photometer로 조직내 Na<sup>+</sup> 및 K<sup>+</sup>함량을 측정하였다. 조직내 Na<sup>+</sup> 및 K<sup>+</sup>함량을 inulin space를 사용해서 세포내 Na<sup>+</sup> 및 K<sup>+</sup>함량으로 교정하여 mEq/L로 나타내었다. Inulin space는 C<sup>14</sup>-inulin이 포함된 용액에서 incubation한 조직을 NaOH로 소화시킨 후 liquid scintillation counter를 사용하여 조직내 inulin 함량을 측정해서 계산하였다.

### 6) Na-K-ATPase 활성도의 측정

신피질 조직에서 분리한 microsome내 Na-K-ATP-

ase 활성은 총 ATPase 활성과 Mg<sup>2+</sup>-ATPase 활성과의 차로써 구하였다. 총 ATPase 활성을 측정하는 incubation 용액의 기본 조성은 3 mM ATP, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 10 mM KCl 및 50 mM Tris-HCl(pH 7.4)로 하였고 여기에 효소 단백질을 적당량 첨가하여 총량이 1 ml이 되게 하였다. Mg<sup>2+</sup>-ATPase 활성은 위의 조성중 KCl을 빼고 1 mM ouabain이 들어 있는 용액에서 측정하였다. ATP가 들어 있지 않는 용액에서 10분간 preincubation한 후 ATP를 가하여 10분간 incubation하고 11.67%의 냉한 perchloric acid 0.4 ml을 가하여 반응을 중지시켰다. ATP에서 가수 분해되어 유리된 무기인산의 농도는 Fiske 및 SubbaRow<sup>40)</sup>의 방법으로 측정하였으며  $\mu\text{mole Pi liberated/mg protein/hr}$ 로 나타내었다.

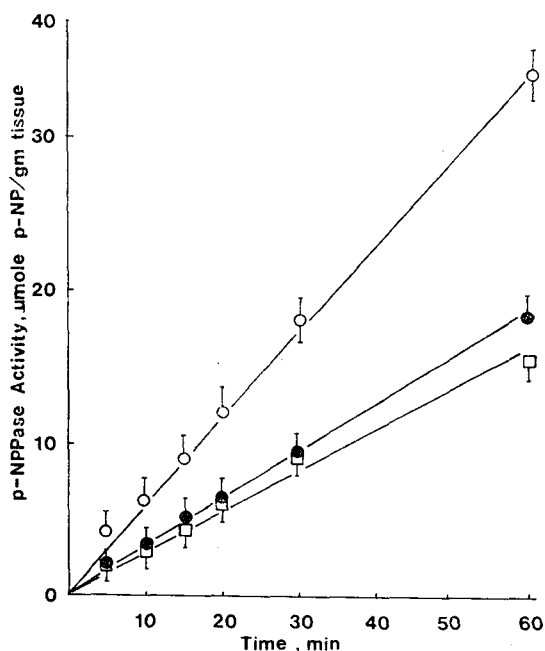


Fig. 1. Time course of p-nitrophenylphosphatase (p-NPPase) activity in slices.

The activities were determined in control medium(○) and in medium containing 1 mM ouabain(□). The K<sup>+</sup>-dependent p-nitrophenylphosphatase(K-pNPPase) activity(●) was taken as the difference between two.

Each point represents mean  $\pm$  S.E. of 3 experiments.

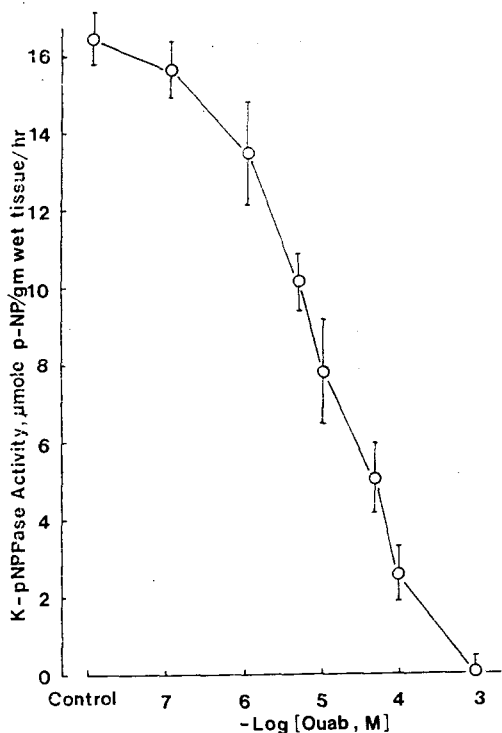


Fig. 2. Effect of ouabain on K-pNPPase activity in slices. Before adding substrate, the slices were treated with each concentration of ouabain in preincubation medium for 10 min. Each point represents mean  $\pm$  S.E. of 4 experiments.

### 실험 성적

#### 1) K-pNPPase 활성도 및 incubation 시간에 따른 변화

5분에서 60분까지 incubation 시간을 변화시키면서 p-NPPase 활성을 측정한 결과 60분간 시간에 직선적으로 비례하여 증가하였다(Fig. 1).

60분에 총 p-NPPase 활성은  $34.1 \mu\text{mole p-NP/gm wet tissue/hr}$  이었고 이중 1 mM ouabain에 의해 억제되는 K-pNPPase 활성은  $18.9 \mu\text{mole p-NP/gm wet tissue/hr}$  로 총 p-NPPase 활성의 약 55.4%로 나타났으며 이 값은 전 incubation 기간에 걸쳐 일정한 값을 보였다.

#### 2) K-pNPPase 활성에 대한 ouabain의 효과

Fig. 2는 ouabain의 농도 변화가 K-pNPPase 활성에 미치는 효과를 나타낸 것으로 농도에 비례하여 억

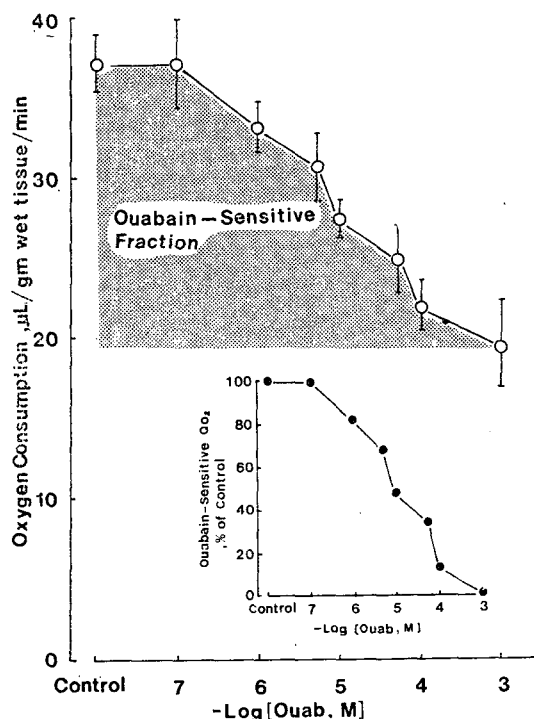


Fig. 3. Effect of ouabain on oxygen consumption in slices. Dotted fraction represents ouabain-sensitive oxygen consumption ( $\text{QO}_2$ ) which is the difference between the amount of oxygen consumed by tissues in control medium and that in medium containing 1 mM ouabain. Inset shows % of control value of ouabain-sensitive oxygen consumption at each concentration of ouabain. Each point represents mean  $\pm$  S.E. of 4 experiments.

제 정도가 증가하였으며 50%를 억제하는 농도는  $7.9 \times 10^{-6} \text{M}$  이었다.

#### 3) 산소 소모량에 대한 ouabain의 효과

정상 상태에서의 산소 소모량은  $38.86 \mu\text{L/gm wet tissue/min}$  였으며 이중 1 mM ouabain에 의해 억제되는 부분은  $18.36 \mu\text{L/gm wet tissue/min}$  로서 전체 산소 소모량의 약 50% 정도였다. 이 값은 Whittam 및 Willis가 가토 심피질 절편에서 보고한 값(40%)보다는 다소 높은 값이었다. 1 mM 이하의 농도에서 ouabain은 농도에 비례하여 산소 소모량을 억제하였으며, ouabain에 영향을 받는 산소 소모량을 50% 억제하는 ouabain의 농도는  $6.3 \times 10^{-6} \text{M}$  이었다. 이 값은 K-pNPPase 활성을 50% 억제하는 농도와 유사하였다

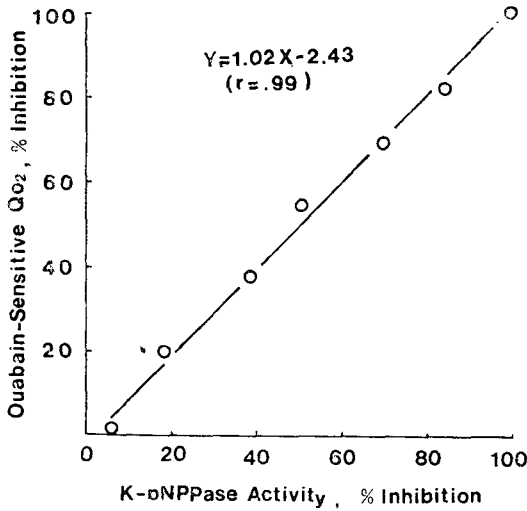


Fig. 4. Relation between K-pNPPase activity and ouabain sensitive oxygen consumption ( $Q_{O_2}$ ). Values represent ouabain-induced inhibition calculated from the results in Fig. 2 and 3.

(Fig. 3).

Fig. 4는 K-pNPPase 활성도와 산소 소모량과의 관계를 살펴보기 위해 ouabain에 의한 K-pNPPase 활성의 억제 정도를 % inhibition으로 가로 축에 나타내고 ouabain에 억제되는 산소 소모량의 억제 정도를 세로축에 나타낸 것이다.

Ouabain에 억제되는 산소 소모량은 K-pNPPase 억제 정도와 직선적인 비례 관계를 보여주었다. 이와같은 결과는 K-pNPPase 활성화와 산소 소모량과의 사이에는 밀접한 관계를 가지고 서로 연관되어 있음을 가르킨다.

#### 4) 세포내 $Na^+$ 및 $K^+$ 함량에 대한 ouabain의 효과

신피질 절편을  $25^{\circ}C$ 에서 산소를 공급하면서 30분간 평형시킨 후 ouabain이 든 용액에서 30분간 incubation 하였을 때 세포내  $Na^+$  및  $K^+$ 의 함량 변화를 Fig. 5에 나타내었다. 정상 용액에서 incubation 한 조직은 세포내 전해질 농도가  $Na^+$ 이 58.4 mEq/L,  $K^+$ 이 91.3 mEq/L였으며 ouabain이 포함된 용액에서는  $Na^+$  농도는 증가하고  $K^+$  농도는 감소하여  $10^{-3}M$ 에서는  $Na^+$  및  $K^+$  농도가 각각 122.0 및 43.2 mEq/L로  $Na^+$ 은 63.6,  $K^+$ 은 48.1 mEq/L의 변화를 보였다. Ouabain에 의한 이들 전해질 함량 변화의 50% 효과를 나타낸 ouabain의 농도는  $Na^+$ 에서  $4.0 \times 10^{-5}M$ ,  $K^+$ 에서  $1.5 \times 10^{-5}M$ 로서 K-pNPPase 활성을 50% 억제하는 농도와

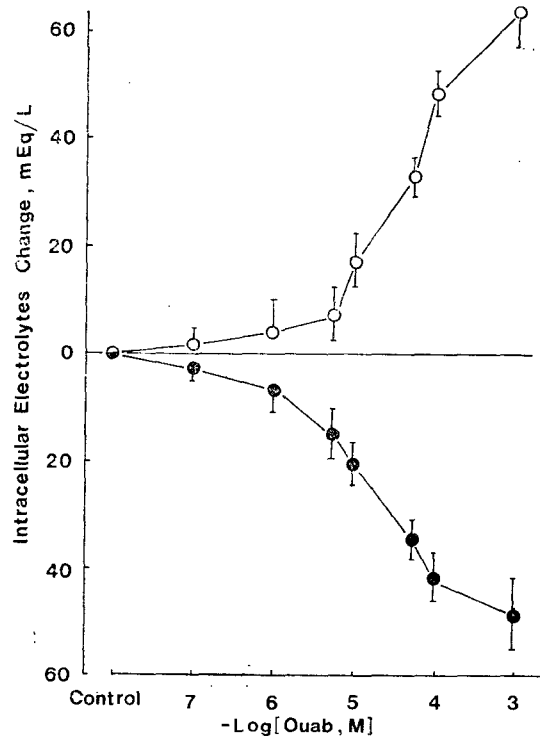


Fig. 5. Effect of ouabain on intracellular electrolytes content. Values represent ouabain-induced increase of  $Na^+$  (○) or decrease of  $K^+$  (●) concentrations compared to the control value. The control value of intracellular  $Na^+$  and  $K^+$  concentrations were 58.4 and 91.3 mEq/L respectively. Each point represents mean  $\pm$  S.E. of 4 experiments.

유사하였다.

#### 5) Na-K-ATPase 활성도와 의 관계

Fig. 6은 microsome에서 측정된 Na-K-ATPase 활성과 절편에서 측정된 K-pNPPase 활성, 산소 소모량 및 세포내 전해질 함량의 변화를 함께 나타낸 것이다. 일반적으로  $10^{-3}M$  ouabain은  $Na^+$ - $K^+$  교환 펌프 활성을 완전히 억제하는 것으로 알려져 있어,  $10^{-3}M$  ouabain에 의한 억제나 전해질 함량의 변화 정도를 100%로 했을 때의 각 농도에서의 ouabain의 효과를 나타내었다. Na-K-ATPase 활성을 50% 억제하는 ouabain의 농도는  $1.2 \times 10^{-6}M$ 로서 K-pNPPase나 ouabain에 영향을 받는 산소 소모량의 50% 억제 농도보다 낮은 값을 보여 주고 있다. 실험된 모든 ouabain 농도에 걸쳐서 산소 소모량 및 전해질 함량의 변화는 micros-

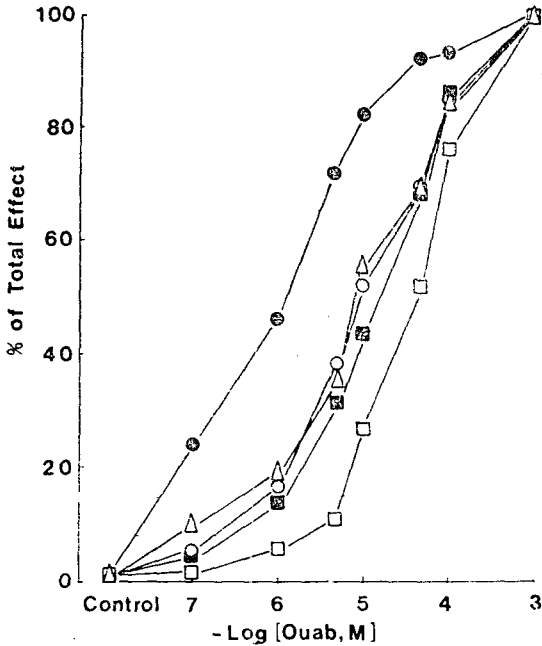


Fig. 6. Effect of ouabain on Na-K-ATPase activity (●). For comparison, K-pNPPase activity (○), ouabain-sensitive oxygen consumption(△) and intracellular electrolytes changes(□ : Na<sup>+</sup> gain, ■ : K<sup>+</sup> loss) in slices are also shown together. Values represent % effect of total inhibition or change by 1 mM ouabain. The control value of Na-K-ATPase activity was 32.6 μmole Pi/mg protein/hr.

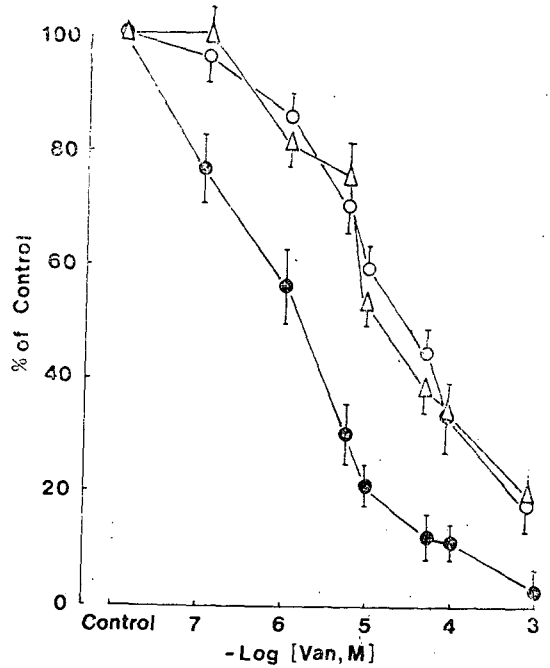


Fig. 7. Effect of vanadate on K-pNPPase activity (○) and ouabain-sensitive oxygen consumption(△) in slices and Na-K-ATPase activity in microsome(●). Each point represents mean ± S.E. of 4 experiments.

ome에서 측정된 Na-K-ATPase 활성보다는 절편에서 측정된 K-pNPPase 활성의 변화와 더 유사한 양상을 보여주었다.

6) K-pNPPase 활성, 산소 소모량, Na-K-ATPase 활성 및 세포내 전해질 함량에 대한 vanadate의 효과

Vanadate는 ouabain과는 달리 세포내부에서 효소와 결합하여 작용하며<sup>4,8)</sup> 또한 대사작용에 의해 Na-K-ATPase 활성에 대한 억제작용이 약한 vanadyl이온으로 환원되기 때문에<sup>7,14)</sup> 정상세포에서와 microsome에서의 효과가 매우 다를 것으로 생각된다.

Fig. 7은 microsome에서 측정된 Na-K-ATPase 활성과 절편에서 측정된 K-pNPPase 활성 및 ouabain에 영향을 받는 산소 소모량에 대한 vanadate의 효과를 나타낸 것이다. Na-K-ATPase 활성을 50% 억제하는

vanadate의 농도는  $1.6 \times 10^{-6} M$ 이었으며  $10^{-3} M$ 에서는 거의 100%억제를 보였다. 그러나 K-pNPPase 및 ouabain에 영향을 받는 산소 소모량을 50% 억제하는 농도는 각각  $1.3 \times 10^{-5} M$  및  $2.5 \times 10^{-6} M$ 로서 Na-K-ATPase에서의 값보다 훨씬 높은 값을 보여주었다. 또한 Na-K-ATPase 활성을 완전히 억제하는  $10^{-3} M$ 에서도 K-pNPPase 활성과 ouabain에 영향을 받는 산소 소모량은 20%정도 남아 있어 microsome과 절편에 대한 vanadate의 작용이 많은 차이를 보이고 있음을 알 수 있다.

신 절편에서 Na<sup>+</sup> 및 K<sup>+</sup>의 함량이 vanadate에 의해 영향을 받는 정도는 약물의 농도에 비례하여 이들 이온들의 함량이 변화하였으며  $10^{-3} M$  vanadate 농도에서 Na<sup>+</sup>은 53.2 mEq/L에서 105 mEq/L까지 증가하여 51.8 mEq/L의 변화를 보였으며 K<sup>+</sup>은 97.5 mEq/L에서 49.7 mEq/L까지 감소하여 47.8 mEq/L의 변화를 보였고 50%변화량을 보인 vanadate의 농도는 Na<sup>+</sup>에서  $2.5 \times 10^{-6} M$ , K<sup>+</sup>에서는  $1.3 \times 10^{-6} M$ 로서 이들 농도는 K-pNPPase 활성을 50% 억제하는 농도와 유사하였다(Fig. 8).

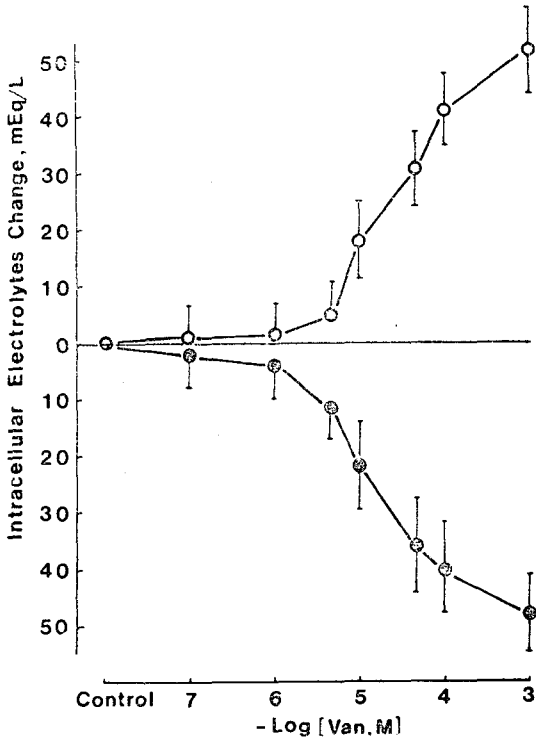


Fig. 8. Effect of vanadate on intracellular electrolytes content. Values represent vanadate-induced increase of intracellular Na<sup>+</sup>(○) or decrease of K<sup>+</sup>(◼) concentrations compared to the control values. Each point represents mean ± S.E. of 4 experiments.

### 고찰

Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>교환 펌프는 세포의 전해질 환경유지<sup>6)</sup> 뿐만 아니라 신경세포의 흥분전달<sup>37)</sup>, 그리고 근육의 수축등<sup>24)</sup> 여러가지 생리적 기능에 관계하고 있으며, 여러 조직의 상피세포에서는 Na<sup>+</sup>뿐만아니라 여러가지 무기, 유기물질의 흡수 및 분비에도 관여하고 있다함은 주지의 사실이다<sup>17, 23, 31)</sup>. 이 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>교환 펌프는 ATP를 에너지 원으로 사용하는 것으로 밝혀졌고<sup>6)</sup>, Skou에 의해 개의 말초신경의 homogenate에서 Na-K-ATPase의 존재가 처음 발견됨으로서 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>교환 펌프가 Na-K-ATPase일 것으로 추측하였다. 그 후 Jørgensen 등<sup>20)</sup>에 의한 면역학적 관찰과 순수 분리한 Na-K-ATPase를 이용한 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>교환 펌프의 재구성등<sup>33, 16)</sup>으로 그와 같은 사실이 확인되었다.

이후 생체막에서의 물질 이동이나 여러가지 세포 기능과 Na-K-ATPase 활성화과의 관계에 대해 많은 연구

가 이루어져 왔으며 특히 ouabain 등 Na-K-ATPase에 특이적으로 작용하는 약물을 이용함으로써 이 효소의 역할에 대한 연구가 많이 이루어졌다<sup>12)</sup>. 그러나 이 효소의 활성을 측정하는 데는 homogenate나 microsome을 이용함으로써 정상 세포막에서의 효소 활성을 평가하는 데는 어려움이 있다. Spencer 등<sup>39)</sup>도 homogenate에서 측정된 Na-K-ATPase 활성에 대한 ouabain의 효과를 신 절편과 같은 정상 세포막에 대한 효과로 그대로 적용하기는 어렵다고 하였으며 그 이유로서 다음과 같은 점을 지적하였다. 즉 homogenate에서는 효소가 약물에 바로 노출되지만 신 절편에서는 약물이 효소에 작용을 나타내려면 조직내로 확산되어 들어가야 하며, 또한 세포막이 파괴되면 세포막 내의 축간의 효소의 기능적 위치 관계가 없어져 homogenate나 microsome에서 최대 효소 활성을 나타내는 조건을 intact cell에서는 그대로 적용하거나 만들기 어렵기 때문이라고 하였다. 특히 세포막 내에서 효소에 작용을 나타내는 약물들은 homogenate나 microsome에서 측정된 효과와 정상 세포막에서 나타내는 효과와는 차이가 클 것으로 추측할 수 있다.

K-pNPPase는 1962년 Judah 등<sup>21)</sup>에 의해서 Na-K-ATPase가 포함된 적혈구 막 분획에서 K<sup>+</sup>에 의해 촉진되는 phosphatase 활성이 발견됨으로서 처음으로 알려졌다. 이후 여러가지 많은 조직에서 K-pNPPase 활성이 존재함이 밝혀지고<sup>33)</sup> 그 분포가 Na-K-ATPase의 분포와 비슷하여<sup>33)</sup> Na-K-ATPase와 같은 효소일 것이라고 시사되었다.

Bader 및 Sen<sup>3)</sup>에 의하면 이 phosphatase는 다음과 같은 몇가지 점에서 Na-K-ATPase와 공통점을 갖는다고 한다. 첫째, Mg<sup>2+</sup>, Rb<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>등에 의해 활성이 촉진되며 그 Km치가 동일하다는 점, 둘째로 ouabain, calcium, 수은 및 fluoride이온등에 의해 공통적으로 억제되며 그 Ki치가 같으며, 셋째로 최적 pH나 activation energy가 같다는 점이다. 이외에도 여러가지 공통점들이 많이 발견된 반면 많은 차이점도 발견되었다<sup>33)</sup>. 그러나 Jørgensen 과 Skou<sup>19)</sup> 그리고 Lane 등<sup>26)</sup>에 의해 순수 분리된 Na-K-ATPase 단백질에서 K-pNPPase 활성이 존재함이 밝혀져 Na-K-ATPase와 K-pNPPase 활성이 같은 효소의 작용에 의해 일어남이 입증되었다. 오늘날에는 K-pNPPase 활성이 Na-K-ATPase의 작용 과정에서 탈인산화 과정과 연관된 것이 일반적으로 인정되고 있으며<sup>18, 33)</sup> Na-K-ATPase의 특성을 연구하는데 널리 이용되고 있다.

ATP와는 달리 K-pNPPase의 기질인 p-NPP는 세

포막 외측에서 효소와 결합하기 때문에 세포 외부 배양액에 기질을 첨가해서, 신 절편과 같은 정상 세포막에서도 쉽게 그 활성의 측정이 가능하다<sup>2,26,29</sup>. 본 실험 결과에서도 K-pNPPase 활성이 60분까지 시간에 직선적으로 비례해서 증가하여 아주 작은 조직 절편에서도 쉽게 측정이 가능함을 보여 주고 있다(Fig. 1). 본 실험에서 신피질 절편에서 측정된 K-pNPPase 활성에 대한 ouabain의 억제 정도는 microsome에서 측정된 Na-K-ATPase 활성에 대한 억제 정도보다 낮게 나타났다(Fig. 6). Bader와 Sen<sup>3)</sup>의 보고에 의하면 microsome에서 Na-K-ATPase와 K-pNPPase 활성에 대한 ouabain의 억제 정도가 비슷한 것으로 알려져 있어 microsome과 신피질 절편에서의 ouabain에 대한 감수성에 차이가 있음을 보여 주고 있다. Ouabain에 민감한 산소 소모량에 대한 ouabain의 억제 효과나 세포내 전해질 함량 변화에 대한 ouabain의 효과가 microsome에서 측정된 Na-K-ATPase 활성보다 절편에서 측정된 K-pNPPase 활성에 대한 영향과 유사하게 나타났으며(Fig. 6) 또 ouabain에 의해 억제되는 산소소모량에 대한 ouabain의 효과를 K-pNPPase 활성에 대한 억제와 비교하면 기울기가 1.02인 직선적인 비례관계를 나타내었다(Fig. 4). 이러한 결과들은 K-pNPPase 활성이 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>교환 펌프 활성을 나타내는 좋은 지표가 되며 특히 약물의 효과를 관찰할 때는 microsome에서 측정된 Na-K-ATPase 활성보다 더 유용한 지표가 될 수 있음을 시사한다.

Microsome에서 나타내는 약물의 효과와 신 절편에서 나타내는 효과의 차이는 vanadate를 이용한 실험 결과에서 더욱 뚜렷이 볼 수 있다. Fig. 7에 나타낸 바와같이 신피질 절편에서 측정된 K-pNPPase 활성 및 ouabain에 의해 억제되는 산소 소모량에 대한 vanadate의 작용과 microsome에서 측정된 Na-K-ATPase 활성에 대한 작용간에는 뚜렷한 감수성의 차이를 보여 microsome에서 Na-K-ATPase 활성을 완전히 억제하는 10<sup>-3</sup>M의 농도에서도 절편에서 K-pNPPase 활성이나 ouabain에 의해 억제되는 산소 소모량은 20%정도 남아 있었다.

1975년 Charney 등<sup>9)</sup>에 의해 Na-K-ATPase 억제물질로 보고된 vanadate는 microsome에서는 강력한 Na-K-ATPase 억제제로 알려져 있지만<sup>22,42,43</sup> in vivo 실험이나 정상 세포에서는 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>교환 펌프의 억제와 연관된 작용은 신장 세포등 vanadate 축적 작용이 있는 조직 외에는 미미하며 그 작용이 나타나더라도 예상보다 약한 것으로 보고되고 있다<sup>25</sup>. 이러한 차이는

정상 세포에서 나타내는 vanadate의 작용이 ouabain과 다른 다음 두 가지 점을 고려하면 알 수 있다. 첫째는 세포막 외측에서 작용하는 ouabain과 달리 vanadate는 Na-K-ATPase에 대한 작용 부위가 세포막 내측에 있기 때문에<sup>4,8)</sup> vanadate가 작용을 나타내려면 먼저 세포 내부로 이동되어야 하며, 둘째는 세포 내부로 들어간 vanadate의 일부는 Na-K-ATPase에 대한 억제 작용이 약한 vanadyl 이온으로 환원되거나 단백질과 결합하여 그 작용이 소실된다는 점이다<sup>7,14)</sup>. 따라서 microsome 등과 같이 세포막이 파괴되고 세포내 대사 과정을 소실한 세포 분획에서 측정된 Na-K-ATPase 활성에 대한 vanadate의 효과는 신 절편 등과 같이 정상 세포막에서 나타내는 효과와는 많이 다를 것으로 추측할 수 있으며 본 실험 결과도 이러한 추측과 일치한다. 그러나 신피질 절편에서 측정된 K-pNPPase 활성은 ouabain에 의해 억제되는 산소 소모량이나 세포내 전해질 함량의 변화와 밀접한 연관을 보이고 있고 50% 억제 농도도 유사하였다.

이상의 결과로 미루어 가토 신피질 절편에서 측정된 K-pNPPase 활성은 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>교환 펌프의 활성을 나타내는 좋은 지표가 될 수 있으며 특히 세포막을 통한 물질 이동이나 세포의 기능에 대한 영향과 Na-K-ATPase 활성에 대한 영향을 동시에 보고자 할 때는 microsome에서 Na-K-ATPase 활성을 측정하는 것보다 절편에서 K-pNPPase 활성을 측정하는 것이 더욱 이상적임이 사료된다.

## 요 약

Na-K-ATPase의 일부로 알려져 있으며 intact cell에서도 쉽게 활성의 측정이 가능한 K-pNPPase 활성을 신피질 절편에서 측정하여 ouabain에 영향을 받는 산소 소모량 및 세포내 전해질 함량, 그리고 microsome에서 측정된 Na-K-ATPase 활성에 대한 ouabain 및 vanadate의 효과를 비교 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

- 1) 신피질 절편에서 p-NPPase 활성은 60분간 시간에 직선적으로 비례하여 증가하였고 이중 1 mM ouabain에 의해 억제되는 K-pNPPase 활성은 약 55% 정도로서 전 incubation 기간 중 일정한 값을 보였다.
- 2) K-pNPPase 활성을 50% 억제하는 ouabain 및 vanadate의 농도는 각각 7.9×10<sup>-6</sup>M과 1.3×10<sup>-5</sup>M이었다.
- 3) 신피질 절편에서 측정된 전체 산소 소모량 중



1 mM ouabain에 의해 억제되는 부분(ouabain-sensitive fraction)에 대한 ouabain과 vanadate의 50% 억제 농도는 각각  $6.3 \times 10^{-6}M$ 과  $2.5 \times 10^{-5}M$ 로서 K-pNPPase에서의 값과 유사하였다.

4) Ouabain 및 vanadate에 의한 세포내  $Na^+$  및  $K^+$ 함량의 변화 양상은 절편에서 측정된 K-pNPPase 활성의 변화 양상과 유사하였다.

5) Microsome에서 측정된 Na-K-ATPase 활성은  $10^{-8}M$ 의 ouabain이나 vanadate에 의해 완전 억제되었으며 50% 억제 농도는 각각  $1.2 \times 10^{-6}M$ 과  $1.6 \times 10^{-6}M$ 로 1 mM ouabain에 영향을 받는 K-pNPPase 활성 및 산소 소모량을 50% 억제하는 농도보다 ouabain은 약 5배 vanadate는 약 15배 정도 낮았다.

이상의 결과로 미루어 가토 신피질 절편에서 측정된 K-pNPPase 활성은  $Na^+$ - $K^+$ 교환 펌프의 활성을 나타내는 좋은 지표가 될 수 있으며 특히 세포막을 통한 물질 이동이나 세포의 기능에 대한 영향과 Na-K-ATPase 활성화에 대한 영향을 동시에 보고자 할 때는 microsome에서 측정된 Na-K-ATPase 활성보다 더 이상적이라고 사료된다.

## REFERENCES

- 1) Albers, R.W.: *Biochemical aspects of active transport*. *Annu. Rev. Biochem.*, 36:727, 1967.
- 2) Askari, A. and Rao, S.N.: *Studies on the partial reactions catalyzed by the  $(Na^+ + K^+)$ -activated ATPase. III. Relation of the  $K^+$ -dependent p-nitrophenyl phosphatase to  $Na^+$  transport in red cell ghosts*. *Biochim. Biophys. Acta*, 241:75, 1971.
- 3) Bader, H. and Sen, A.K.:  *$K^+$ -dependent acyl-phosphatase as part of the  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase of cell membranes*. *Biochim. Biophys. Acta*, 118:116, 1966.
- 4) Beauge, L.A. and Dipolo, R.: *Vanadate selectively inhibits the  $K^+$ -activated  $Na^+$  efflux in squid axons*. *Biochim. Biophys. Acta*, 551:220, 1979.
- 5) Bently, P.J.: *Endocrines and osmoregulation*, Springer-Verlag, Berlin, 1971.
- 6) Caldwell, P.C., Hodgkin, A.L., Keynes, R.D. and Shaw, T.I.: *The effect of injecting energy-rich phosphate compounds on the active transport of ions in the giant axons of loligo*. *J. Physiol.*, 152:561, 1960.
- 7) Cantley, L.C. and Aisen, P.: *The fate of cytoplasmic vanadium*. *J. Biol. Chem.*, 254:1781, 1979.
- 8) Cantley, L.C. Jr., Resh, M.D. and Guidotti, G.: *Vanadate inhibits the red cell  $(Na^+ + K^+)$ -ATPase from the cytoplasmic side*. *Nature (London)*, 272:552, 1978.
- 9) Charney, A.N., Silva, P. and Epstein, F.H.: *An in vitro inhibitor of Na-K-ATPase present in an adenosine triphosphate preparation*. *J. Appl. Physiol.*, 39:156, 1975.
- 10) Dahl, J.L. and Hokin, L.E.: *The Na-K-ATPase*. *Annu. Rev. Biochem.*, 43:327, 1974.
- 11) Fiske, C.H. and SubbaRow, Y.: *The colorimetric determination of phosphorus*. *J. Biol. Chem.*, 66:375, 1925.
- 12) Glynn, I.M.: *The action of cardiac glycosides on ion movements*. *Pharmacol. Rev.*, 16:381, 1964.
- 13) Goldin, S.M. and Tong, S.W.: *Reconstitution of active transport catalyzed by the purified  $Na^+$  and  $K^+$  ion stimulated adenosine triphosphatase from canine renal medulla*. *J. Biol. Chem.*, 249:3907, 1974.
- 14) Grantham, J.J. and Glynn, I.M.: *Renal Na-K-ATPase: Determinants of inhibition by vanadium*. *Am. J. Physiol.*, 236:F530, 1979.
- 15) Gubitz, R.H., Akera, T. and Brody, T.M.: *Control of brain slice respiration by  $(Na^+ + K^+)$ -activated adenosine triphosphatase and the effects of enzyme inhibitors*. *Biochim. Biophys. Acta*, 459:263, 1977.
- 16) Hokin, L.E.: *Purification and properties of the sodium, potassium ATPase*. *Annu. N.Y. Acad. Sci.*, 242:12, 1974.
- 17) Hokin, L.E. and Dahl, J.L.: *The sodium-potassium adenosine triphosphatase*. In *Metabolic Pathways, Metabolic Transport*, ed. by L.E. Hokin, vol VI, Academic Press, New York, 1972, pp.267-315.
- 18) Jørgensen, P.L. and Skou, J.C.: *Preparation*

- of highly active( $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ )-ATPase from outer medulla of rabbit kidney. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 37:39, 1969.
- 19) Jørgensen, P.L. and Skou, J.C.: Purification and characterization of ( $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ )-ATPase. I. The influence of detergents on the activity of ( $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ )-ATPase in preparation from the outer medulla of rabbit kidneys. *Biochim. Biophys. Acta*, 233:366, 1971.
- 20) Jørgensen, P.L., Hansen, O., Glynn, I.M. and Carieres, J.D.: Antibodies to pig kidney( $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ )-ATPase inhibit the  $\text{Na}^+$  pump in human red cells provided they have access to the inner surface of the cell membrane. *Biochim. Biophys. Acta*, 291:795, 1973.
- 21) Judah, J.D., Ahmed, K. and McLean, A.E.M.: Ion transport and phosphoproteins of human red cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 65:472, 1962.
- 22) Jung, J.S. and Lee, S.H.: Effect of vanadate on PAH transport and Na-K-ATPase activity in rabbit renal cortex. *Korean J. Physiol.*, 17(2):143, 1983,
- 23) Kaback, H.R.: Transport, *Annu. Rev. Biochem.*, 39:561, 1970.
- 24) Katz, B.: *Nerve, muscle, and synapse*, McGraw-Hill, New York, 1966.
- 25) Lambotte, L.: Vanadate uptake and inhibition of the sodium pump in perfused dog liver. *Arch. Int. Physiol. Biochim.*, 91:9, 1983.
- 26) Lane, L.K., Copenhayer, J.H., Lindenmayer, G.E. and Schwartz, A.: Purification and characterization of and ( $^3\text{H}$ ) ouabain binding to the transport adenosine triphosphatase from outer medulla of canine kidney. *J. Biol. Chem.*, 248:7197, 1973.
- 27) Lowry, O.H., Rosenbrough, N.L., Farr, A.L. and Randell, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265, 1951.
- 28) Maggie, M.S., Stewart, D.J. and Sen, A.K.: Activation of ouabain-sensitive p-nitrophenyl phosphatase by carbachol and GMP in rat sub-mandibular gland. *Can. J. Biochem.*, 58:1223, 1980.
- 29) Philipson, K.D. and Edelman, I.S.: Thyroid hormone control of  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase and  $\text{K}^+$ -dependent phosphatase in rat heart. *Am. J. Physiol.*, 232(3):C196, 1977.
- 30) Proverbio, F., Robinson, J.W.L. and Whittembury, G.: Sensitivities of ( $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ )-ATPase and  $\text{Na}^+$  extrusion mechanisms to ouabain and ethacrynic acid in the cortex of the guinea-pig kidney. *Biochim. Biophys. Acta*, 211:327, 1970.
- 31) Rega, A.F. and Garrahan, P.J.: In the *Enzymes of Biological Membranes*, ed. by A. Martonosi, vol. 3, Plenum Press, New York, 1976, pp.303-314.
- 32) Schultz, S.G. and Curran, P.F.: Coupled transport of sodium and organic solutes. *Physiol. Rev.*, 50:637, 1970.
- 33) Schwartz, A., Lindenmayer, G.E. and Allen, J.C.: The sodium-potassium adenosine triphosphatase: Pharmacological, Physiological and biochemical aspects. *Pharma. Rev.*, 27:3, 1975.
- 34) Sejersted, O.M., Steen, P.A. and Kiil, F.: Energetics of tubular sodium reabsorption sensitive to ethacrynic acid and ouabain. *Am. J. Physiol.*, 242:F254, 1982.
- 35) Skou, J.C.: The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim. Biophys. Acta*, 23:394, 1957.
- 36) Soltoff, S.P. and Mandel, L.J.: Active ion transport in the renal proximal tubule. I. Transport and metabolic studies. *J. Gen. Physiol.*, 84:601, 1984.
- 37) Somjen, G.G.: *Electrophysiology of neuroglia*. *Annu. Rev. Physiol.*, 37:163, 1975.
- 38) Spencer, A.M., Sack, J. and Hong, S.K.: Relationship between PAH transport and Na-K-ATPase activity in the kidney. *Am. J. Physiol.*, 236:F126, 1979.
- 39) Stewart, D.J. and Sen, A.K.: Role of cyclic GMP in cholinergic activation of Na-K pump in duck salt gland. *Am. J. Physiol.*, 240:C

- 207, 1981.
- 40) Whittam, G. and Proverbio, F.: *Two modes of Na<sup>+</sup> extrusion in cells from guinea pig kidney cortex slices. Pflugers Arch.*, 361:1, 1970.
- 41) Whittam, R. and Willis, J.S.: *Ion movements and oxygen consumption in kidney cortex slices. J. Physiol.*, 168:158, 1963.
- 42) Woo, J.R., Han, B.K. and Lee, S.H.: *Effect of vanadate on Na-K-ATPase activity of rabbit kidney cortex. Korean J. Physiol.*, 17(2):161, 1983.
- 43) Yanagisawa, M., Lechene, L. and Guidotti, G.: *Vanadate is a potent (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)-ATPase inhibitor found in ATP derived from muscle. J. Biol. Chem.*, 252:7421, 1977.